

0-772697

На правах рукописи



Григорьев Павел Николаевич

**СВОЙСТВА И ТОПОГРАФИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ КАЛЬЦИЙ-
СВЯЗЫВАЮЩИХ САЙТОВ ЭКЗОЦИТОЗА И ЭНДОЦИТОЗА
СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ В ДВИГАТЕЛЬНОМ НЕРВНОМ
ОКОНЧАНИИ**

03.00.13-физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Казань-2008

Работа выполнена в ГОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет
Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию РФ»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАМН,
Заслуженный деятель науки РФ,
Зефилов Андрей Львович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор,
Заслуженный деятель науки РФ и РТ,
Ситдииков Фарит Габдулхакович;
доктор медицинских наук, профессор
Волков Евгений Михайлович

Ведущая организация – ГОУ ВПО «Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова»

Защита состоится «5» сентября 2008 года в 10 часов на заседании
диссертационного совета Д 208.034.01 при ГОУ ВПО «Казанский государственный
медицинский университет» (420012, Казань, ул. Бутлерова, 49)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ГОУ ВПО Казанского
государственного медицинского университета (420012, Казань, ул. Бутлерова, 49, корпус Б).

Автореферат разослан «3» ноября 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000510604

013 af

Залялютдинова Л.Н.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Везикулярный цикл представляет собой уникальный механизм, благодаря которому происходит повторное использование синаптических везикул (СВ) в процессах секреции медиатора из нервных окончаний (НО) химического синапса. Основными этапами везикулярного цикла являются: экзоцитоз, сопровождающийся секрецией кванта медиатора в синаптическую щель и эндоцитоз, завершающийся образованием новой везикулы [T.C. Sudhof, 2008; А.Л. Зефирова, 2007; E.T. Kavalali, 2007]. Выделяют следующие механизмы экзоцитоза: полный экзоцитоз, для которого характерно слияние мембраны везикулы с пресинаптической мембраной, и частичный экзоцитоз, по типу kiss-and-run, при котором происходит образование временной поры между содержимым СВ и синаптической щелью [S.O. Rizzoli and R. Jahn, 2007]. Процессы экзоцитоза и эндоцитоза являются тесно связанными, однако механизмы, обеспечивающие эту связь, не раскрыты. Среди факторов, способных нарушить соотношение процессов экзо- и эндоцитоза, можно отметить отсутствие во внеклеточном растворе двухвалентных катионов [A.L. Zefirov et al., 2006].

Для изучения цикла СВ широко используются электрофизиологический и оптический подходы [M. Khvotchev and E.T. Kavalali, 2008]. Комбинация двух подходов в экспериментах по изучению эндоцитоза является необходимой, т.к. изменения эндоцитоза при каких-либо воздействиях могут быть связаны с их эффектами на экзоцитоз. Поэтому обычно предварительно используются электрофизиологические методы, которые позволяют количественно оценивать секрецию медиатора и судить об экзоцитозе СВ. Далее применяется флуоресцентный метод, например, с использованием красителя FM 1-43, который при эндоцитозе захватывается во вновь образующиеся везикулы и «загружается» в НО. Использование этого метода при соблюдении условия одинаковой секреции медиатора позволяет судить об интенсивности процессов эндоцитоза, а также оценивать тип экзоцитоза – полный или kiss-and-run [M.A. Cousin, 2008; S.O. Rizzoli et al., 2003, А.Л. Зефирова, 2007].

В инициации процессов экзоцитоза решающую роль отводят внутриклеточным ионам Са, которые поступают в НО через потенциал-зависимые Са-каналы пресинаптической мембраны и взаимодействуют со специфическими сайтами [E.R. Chapman, 2008; T.C. Sudhof, 2004; G.J. Augustine, 2001]. Многочисленные исследования показали, что в процессах слияния везикул и секреции медиатора задействованы разные Са-связывающие сайты экзоцитоза, отличающиеся по локализации, аффинности к ионам Са и катионам других щелочноземельных металлов (Sr, Ba). Активация этих сайтов лежит в основе различных видов секреции медиатора: 1) вызванной (фазной) – связанной с возникновением пресинаптического потенциала действия (ПД) и 2) спонтанной – возникающей в отсутствии

ПД [J. Del Castillo and B. Katz, 1954; W. Van Der Kloot and J. Molgo, 1994; E. Neher and T. Sakaba, 2008]. Топографию и афинность Са-сайтов экзоцитоза удобно описывать двумя основными моделями. Модель Са-микродомена предполагает расположение низкоаффинного сайта экзоцитоза в непосредственной близости от Са-канала (десятки нм), который активируется короткоживущим облаком повышенной (сотни мкМ) концентрации кальция при открытии канала. Модель макродомена предполагает наличие высокоаффинного сайта на более удаленном расстоянии (сотни нм) от Са-канала. В этом случае активация экзоцитоза происходит при концентрации Са менее 10 мкМ, и связана с открытием нескольких (множества) близкорасположенных каналов [G.J. Augustine et. al., 2003; E. Neher, 1998; E. Neher and T. Sakaba, 2008]. Определить, по какой из моделей осуществляется активация сайта - Са-микродоменом или Са- макродоменом, позволяет использование быстрого (BAPTA-AM) и медленного (EGTA-AM) внутриклеточных Са-хелаторов [E. Neher, 1998].

Значение ионов Са в процессах экзоцитоза не столь очевидно, выявлена как их иницирующая, так и ингибирующая роль в процессах рециклирования везикул [A.I. Зефилов, 2007; M.A. Cousin, 2000]. Топография и свойства Са-связывающих сайтов экзоцитоза не определены.

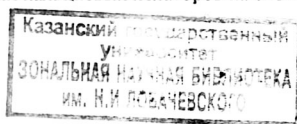
Ключевая роль процессов экзоцитоза и эндоцитоза в синаптических механизмах, недостаточность наших знаний о значении ионов Са в запуске, регуляции и поддержании соотношения процессов экзоцитоза и эндоцитоза, диктуют необходимость исследования расположения относительно Са-каналов пресинаптической мембраны и чувствительности к двухвалентным катионам Са-связывающих сайтов экзоцитоза и эндоцитоза СВ.

Цель и задачи исследования

Целью данного исследования явилось изучение соотношения процессов экзо- и эндоцитоза СВ при различных способах стимуляции экзоцитоза, а также определение топографии и чувствительности Са-связывающих сайтов экзоцитоза и эндоцитоза СВ к ионам Са, Sr, Ba и Mg в двигательном нервном окончании лягушки.

В соответствии с этой целью были поставлены следующие конкретные **задачи**:

- 1) Оценить экзоцитоз СВ при увеличении спонтанной и вызванной секреции медиатора различными способами (деполяризация пресинаптической мембраны гиперкалиевым раствором или постоянным током, экспозиция гипертонического раствора, воздействие кофеина, высокочастотное раздражение);
- 2) Оценить соотношение процессов эндоцитоза и экзоцитоза СВ при стимуляции спонтанной и вызванной секреции медиатора;
- 3) Исследовать влияние быстрого (BAPTA-AM) и медленного (EGTA-AM) внутриклеточных кальциевых хелаторов на спонтанную и вызванную секрецию медиатора;



4) Для оценки топографии Са-связывающих сайтов экзоцитоза и эндоцитоза исследовать влияние быстрого и медленного внутриклеточных кальциевых хелаторов на загрузку и выгрузку красителя FM 1-43 при стимуляции спонтанной и вызванной секреции;

5) Оценить спонтанную и вызванную секрецию медиатора при замене внеклеточных ионов Са на ионы Sr, Ba, Mg.

6) Для оценки свойств Са-связывающих сайтов экзоцитоза и эндоцитоза синаптических везикул исследовать загрузку и выгрузку красителя FM 1-43 при замене внеклеточных ионов Са на ионы Sr, Ba, Mg.

Объект и методы исследования

Эксперименты проводились на нервно-мышечных препаратах кожно-грудинной мышцы лягушки *Rana Ridibunda* в летне-осенний период (август-ноябрь месяцы). Использовано 240 лягушек. Для получения результатов исследования были использованы два экспериментальных подхода. Электрофизиологический подход (внутри- и внеклеточное отведение постсинаптических токов, регистрация мембранного потенциала) позволил количественно оценить секрецию медиатора (экзоцитоз), а оптический подход (конфокальная флуоресцентная микроскопия с использованием красителя FM 1-43) - судить об интенсивности процессов экзоцитоза и эндоцитоза СВ.

Достоверность полученных данных и их научная новизна

Достоверность полученных данных достигалась использованием достаточного и представительного объема экспериментальных исследований, конкретной постановкой и решением поставленных задач с использованием математического анализа и статистического метода. Достоверность различий между популяциями оценивали по критерию Стьюдента.

Впервые показана активация Са-связывающего сайта спонтанной секреции не только ионами Са, Sr, Ba, но и ионами Mg. Впервые показано, что в двигательном нервном окончании лягушки экзоцитоз СВ может происходить по типу kiss-and-run. В работе получены данные, предполагающие наличие внутриклеточного Са-связывающего сайта эндоцитоза СВ в двигательном нервном окончании лягушки. Впервые установлено, что активация Са-связывающего сайта эндоцитоза при спонтанной и вызванной секреции медиатора осуществляется в области Са-микродомена, и данный сайт в нервном окончании обладает чувствительностью к ионам Ba и Sr. Са-связывающие сайты экзоцитоза и эндоцитоза СВ отличаются по топографии и свойствам.

Теоретическая значимость

Проведенное исследование имеет важное теоретическое значение. Работа позволяет более детально определить функциональные возможности химического синапса. Полученные экспериментальные данные расширяют представления о механизмах, участвующих в

осуществлении передачи информации между возбудимыми клетками. Более глубокое понимание механизмов, обеспечивающих процессы экзоцитоза и эндоцитоза, может быть использовано при объяснении процессов, происходящих в центральной нервной системе и лежащих в основе памяти, эмоций, поведения, научения и т.п.; и позволят в дальнейшем влиять на скорость везикулярного цикла, изменения которого могут лежать в основе возникновения и развития некоторых неврологических и психиатрических заболеваний. Учитывая тот факт, что механизмы эндоцитоза являются универсальными для всех видов клеток, результаты работы могут помочь в выяснении механизмов и поиска новых фармакологических препаратов, регулирующих также процессы фагоцитоза и пиноцитоза. В целом, изложенные экспериментальные данные расширяют представления о механизмах передачи информации в химическом синапсе.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- 1) В двигательном нервном окончании лягушки существуют самостоятельные Са-связывающие сайты для экзоцитоза и эндоцитоза СВ, различные по своей природе. При разделной их активации наблюдается разобщение процессов экзоцитоза и эндоцитоза.
- 2) Са-связывающий сайт эндоцитоза СВ расположен в непосредственной близости (десятки нанометров) от потенциалзависимого Са-канала.
- 3) Са-связывающий сайт эндоцитоза и Са-связывающие сайты спонтанного и вызванного экзоцитоза СВ в двигательном нервном окончании характеризуются различной чувствительностью к ионам Са, Sr, Ba, Mg.

Сведения об апробации результатов диссертации

Основные результаты диссертационной работы доложены на конференциях и форумах: международном симпозиуме «Синаптогенез» (Вена, Австрия, 2003), 8-й международной Пушкинской школе-конференции молодых ученых (Пушино, 2004), летней школе IBRO по сенсорным и интегративным нейронаукам (Москва, 2004), международной школе-конференции IBRO по клеточной физиологии "Транспортные механизмы через клеточные мембраны" (Санкт-Петербург, 2004), 9-м FEBS форуме молодых ученых (Визеград, Венгрия, 2005), 5-м Европейском форуме по нейронаукам (Вена, Австрия, 2006), XX Съезде Физиологического общества им. И.П.Павлова, (Москва, 2007), летней школе PENS-Blackwell с углубленным курсом по нейропластичности (Рим, Италия, 2007).

Сведения о публикациях по теме диссертации

Основные положения диссертации отражены в 19-ти научных работах, написанных автором, в том числе двух работ, опубликованных в ведущих зарубежных журналах, пяти работ, опубликованных в российских научных рецензируемых журналах, из них трех – согласно перечню изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией для

опубликования основных результатов диссертаций. Общий объем публикаций – 4.4 условно печатных листа, в т.ч. авторский вклад – 1.8 условно печатных листа.

Личный вклад соискателя

Приведенные в работе данные получены при личном участии соискателя на всех этапах работы, включая составление плана исследования, постановку задач, выбор методов исследования, проведение экспериментов, обработку экспериментальных данных и оформление публикаций. При участии соискателя впервые в России освоен метод флуоресцентной микроскопии с использованием эндоцитозного красителя FM 1-43.

Внедрение результатов работы

Результаты проведенного исследования внедрены в учебный процесс на кафедре нормальной физиологии Казанского государственного медицинского университета, на кафедре физиологии человека и животных Казанского государственного университета и на кафедре анатомии и физиологии Татарского государственного гуманитарно-педагогического университета.

Структура и объем диссертации

Диссертация объемом 131 страница состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список цитируемой литературы включает 243 названия, из них 9 на русском и 234 на английском языках. Диссертация содержит 25 рисунков.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования и растворы. Использовался стандартный раствор Рингера для холоднокровных (Са-раствор) следующего состава (в mM): 117 NaCl, 2,5 KCl, 1,8 CaCl₂, 2,4-2,7 NaHCO₃. Все эксперименты проведены при температуре 20° C, pH поддерживался на постоянном уровне 7.2-7.4. Наряду с Са-раствором использовались растворы, в которых ионы Са были заменены на ионы Sr, Ba или Mg в концентрациях 1,8 mM (Sr-, Ba-, Mg- растворы). Гиперкалиевые растворы содержали увеличенную концентрацию ионов K, а для сохранения осмотичности растворов уменьшалась концентрация ионов Na. В гиперосмотические растворы добавляли сахарозу (25-100 mM). Высокочастотное (20 имп/с) раздражение двигательного нерва проводилось прямоугольными электрическими импульсами длительностью 0,1-0,2 мс сверхпороговой силы. Для блокирования мышечных сокращений использовался тубокурарин ($2 \cdot 10^{-5}$ M).

Для изучения аффинности и расположения сайтов экзо- и эндоцитоза относительно Са-каналов пресинаптической мембраны были использованы два мембранопроницающих

мобильных кальциевых буфера с различной кинетикой связывания ионов Са: ВАРТА-АМ (1,2-bis(2-Aminophenoxy)ethane – N,N,N',N'-tetraacetic acid acetoxymethyl ester) – «быстрый» буфер, и EGTA-АМ (ethylene glycol-bis(2-aminoethylether) ethane – N,N,N',N'-tetraacetic acid acetoxymethyl ester) – «медленный» буфер. Нервно-мышечные препараты выдерживались в инкубационном растворе (концентрация буфера - 100 мкмоль/л, DMSO - 0.1 %, Pluronic - 0.01%) в течение 1 часа, после чего в течение 30 минут отмывались в стандартном растворе.

Регистрация синаптических сигналов и мембранного потенциала. Использовались два метода регистрации синаптических сигналов:

1) Внеклеточная регистрация. Осуществлялось отведение спонтанных, одноквантовых, миниатюрных токов концевой пластинки (МТКП), возникающих при секреции медиатора из небольшого (около 8 мкм) участка нервной терминали [А.Л. Зефилов и др., 1990]. Для регистрации использовали стеклянные микроэлектроды, заполненные 2М раствором NaCl, с диаметром кончика около 1-2 мкм и сопротивлением 1-5 МОм. Для деполяризации НО использовался внеклеточный электрод, подведенный к проксимальному участку НО. В экспериментах с деполяризацией мембраны НО постоянным током использовали тетрадоптоксин в концентрации 1 мкМ. Частоту МТКП определяли по среднему интервалу времени между соседними МТКП (в s^{-1}). В эксперименте микроэлектрод подводился к нескольким участкам различных НО, в каждом из которых регистрировалось 100-200 МТКП.

2) Внутриклеточная регистрация. Осуществлялась регистрация сигналов, связанных с секрецией медиатора во всем НО. Этот вид отведения использовался для анализа вызванных, многоквантовых потенциалов концевой пластинки (ПКП). Использовали стеклянные микроэлектроды с диаметром кончика менее 1 мкм и сопротивлением 2-10 МОм, заполненные 3М раствором KCl. Введение микроэлектрода в мышечное волокно осуществляли в области НО под визуальным контролем. Для определения количества квантов медиатора, освобождаемых из НО в ответ на отдельное раздражение (квантовый состав), использовался анализ дисперсии амплитуды потенциалов концевой пластинки (ПКП) [D. Elmqvist and D.M. Quastel, 1965; J.I. Hubbard and D.F. Wilson, 1973; А.Л. Зефилов и др., 2008].

Флуоресцентная микроскопия.

Для изучения экзоцитоза и эндоцитоза использовался флуоресцентный краситель FM 1-43 (фирма Biotium, США) в концентрации 6 мкМ. При стимуляции секреции медиатора в присутствии красителя FM 1-43 во время эндоцитоза оказывается внутри вновь образующихся СВ («загружается» в НО). При стимуляции секреции медиатора в предварительно окрашенных НО в отсутствие красителя FM 1-43 благодаря процессам экзоцитоза покидает СВ («выгружается» из НО). В экспериментах с выгрузкой красителя предварительную загрузку FM 1-43 в НО осуществляли высокочастотным раздражением 20 имп/сек в

присутствии красителя. Флуоресценцию наблюдали с помощью универсального микроскопа OLYMPUS BX51W1 с конфокальной приставкой. В качестве осветителя использовалась ртутная лампа мощностью 100Вт. Оптика для анализа свечения FM 1-43 включала 480 нм возбуждающий фильтр и 515 нм фильтр эмиссии. Использовались водноиммерсионный объектив LUMPlanFI 60X (0,9 NA) (фирма Olympus). Анализу подвергались только поверхностно расположенные НО. Регистрация изображений осуществлялась черно-белой CCD-камерой F-View II (фирма Olympus), совмещенной через специализированный софт CellP с персональным компьютером. Интенсивность свечения нервных терминалей оценивали в относительных единицах, принимая максимальное свечение пикселя за 1. Значение фонового свечения определяли как среднюю интенсивность свечения в квадрате 50х50 пикселей в участке изображения без НО и впоследствии вычитали из каждого пикселя полученного камерой изображения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Секреция медиатора и экзо-эндоцитоз синаптических везикул при различных способах увеличения спонтанной и стимуляции вызванной секретции медиатора*

Было выбрано несколько способов увеличения спонтанной секреции медиатора. При калиевой деполяризации (уменьшении мембранного потенциала покоя вследствие увеличения внеклеточной концентрации ионов К) и токовой деполяризации (уменьшение мембранного потенциала, возникающее под отрицательным электродом) возникают открытие потенциалзависимых Са-каналов, вход внеклеточных ионов Са и увеличение внутриклеточной концентрации ионов Са [M.I. Glavinjvic, 1988, J.K. Angleson and W.J. Betz, 2001]. Кофеин приводит к освобождению ионов Са из эндоплазматического ретикулума [О.П. Балезина, 2002; A. Martinez-Serrano and J. Satrustegui, 1989]. Гиперосмотический раствор сахарозы стимулирует спонтанную секрецию медиатора по Са-независимому пути [C.F. Stevens and J.H. Williams, 2000].

Оказалось, что при концентрации ионов Са 1.8 мМ в окружающем растворе калиевая или токовая деполяризации, а также добавление кофеина или использование гиперосмотического раствора приводили к быстрому дозозависимому увеличению частоты МТКП (рис. 1 А-Г).

Для последующего изучения процессов эндоцитоза СВ посредством флуоресцентного метода с использованием FM 1-43 необходимо было использовать способы увеличения

* Часть электрофизиологических эксперименты данной части работы выполнены совместно с к.м.н. Абдрахмановым М.М.

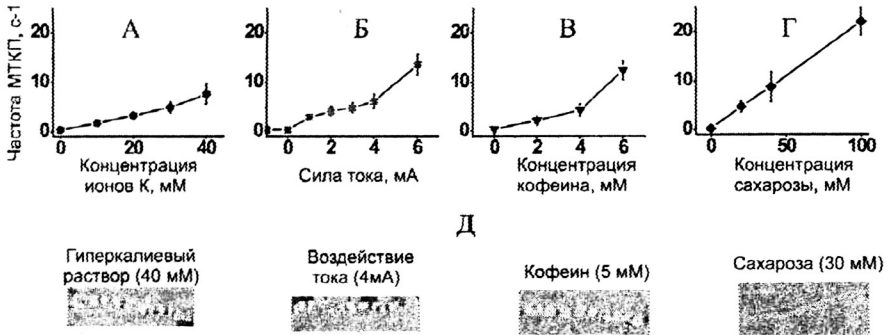


Рис. 1. Спонтанная секреция медиатора и эндоцитоз синаптических везикул при различных воздействиях.

А-Г – частота МТПК, с⁻¹, при различных способах стимуляции спонтанной секреции, внеклеточное отведение.

Д – картины флуоресценции участков НО после стимуляции секреции медиатора (5 мин).

секреции медиатора с примерно одинаковым уровнем экзоцитоза. Поэтому были выбраны такие воздействия, при которых частота МТПК составляет около 7 с⁻¹: гиперкалиевый раствор (К-40 мМ), воздействие постоянного тока силой 4мА, а также добавление кофеина (5 мМ) или сахарозы (30мМ), продолжительность воздействий составляла 5 мин. При калиевой или токовой деполяризации мембраны, а также при экспозиции кофеина в присутствии FM 1-43 происходила загрузка красителя, и в НО можно было обнаружить пространственно-обособленные светящиеся пятна различной величины и интенсивности, являющиеся скоплением везикул, прошедших цикл экзо-эндоцитоза в области активных зон (W.J. Betz and G.S. Bewick, 1993). При использовании гипертонического раствора загрузка FM 1-43 не наблюдалась. В предварительно загруженных красителем НО светящиеся пятна сохранялись в течение длительного времени. Стимуляция экзоцитоза калиевой или токовой деполяризацией, или при воздействии кофеина приводила к выгрузке красителя, выражавшаяся в исчезновении флуоресцирующих пятен и уменьшении свечения терминалей. При действии гипертонического раствора выгрузка красителя отсутствовала.

При стимуляции вызванного экзоцитоза высокочастотным раздражением (20 с⁻¹) препарата в течение 5 мин в присутствии FM 1-43 наблюдалась загрузка красителя. Раздражение предварительно окрашенного препарата приводило к выгрузке FM 1-43.

Т.о., применение способов стимуляции секреции медиатора, при которых происходит увеличение внутриклеточной концентрации ионов Са за счет их входа через Са-каналы

(гиперкалиевая или токовая деполяризация, ритмическое раздражение) или при освобождении ионов Са из внутриклеточных депо (кофеин) наблюдается сохранность соотношения процессов полного экзоцитоза и эндоцитоза СВ, о чем свидетельствует наличие успешной загрузки и выгрузки красителя. В гиперосмотических растворах выраженное увеличение секреции медиатора не сопровождается загрузкой и выгрузкой красителя, что позволяют делать вывод о секреции медиатора по механизму kiss-and-run с образованием короткоживущей поры между СВ и синаптической щелью (kiss-and-run механизм). При этом медиатор способен диффундировать через пору, а FM 1-43 – нет.

Экзо-эндоцитоз синаптических везикул при использовании быстрого и медленного внутриклеточного Са-хелаторов[†]

Помещение нервно-мышечного препарата в гиперкалиевый раствор (К-40 мМ) через 5 мин приводило к увеличению частоты МТКП с 0.23 ± 0.03 имп/с ($n=28$) до 7.25 ± 0.91 имп/с ($n=23$) имп/сек. В препаратах, НО которых предварительно были загружены Са-буферами, аппликация гиперкалиевого раствора также приводила к росту частоты МТКП, однако, менее выраженному (Рис. 2А). Можно отметить, что как быстрый буфер (ВАРТА-АМ), так и медленный (EGTA-АМ) оказывают примерно одинаковое действие ($p > 0.05$).

В препаратах, НО которых были предварительно загружены медленным Са-буфером, EGTA-АМ, пятиминутная аппликация гиперкалиевого раствора, содержащего FM 1-43, вызывала появление в НО ярко светящихся пятен (Рис. 2Б-В). В этих условиях применение быстрого буфера (ВАРТА) не приводило к появлению светящихся пятен, что свидетельствует о нарушении процессов эндоцитоза СВ (Рис. 2Б-В).

В стандартном растворе квантовый состав первого ПКП в серии составлял 470 ± 80 квантов ($n=8$). В процессе высокочастотного раздражения с частотой 20 имп/с наблюдалось постепенное снижение квантового состава ПКП, который через 3 мин раздражения составлял $8,2 \pm 2,7$ % ($n = 8$) от исходного уровня. В препаратах, НО которых предварительно были загружены EGTA-АМ или ВАРТА-АМ, исходный квантовый состав составлял 390 ± 90 квантов ($n=6$) и 80 ± 20 квантов ($n=6$), соответственно, а снижение квантового состава ПКП через 3 мин раздражения происходило до 11.5 ± 3.8 % ($n = 6$) и 35.3 ± 10.2 % ($n = 6$) от исходного уровня, соответственно. Сравнение кумулятивных кривых количества освобожденных квантов медиатора при высокочастотном раздражении двигательного нерва показало, что

[†] Часть электрофизиологических экспериментов по высокочастотному раздражению в данной части работы выполнены совместно с ассистентом КГМУ, к.м.н., Мухамедьяровым М.А.

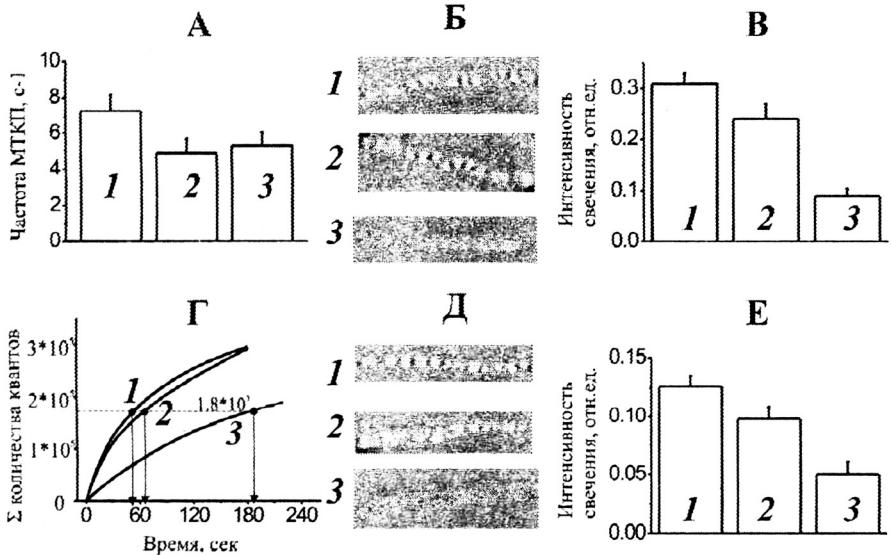


Рис. 2. Секретия медиатора и загрузка красителя при использовании быстрого и медленного внутриклеточных кальциевых хелаторов.

1 – контрольные опыты, 2 – опыты с EGTA-AM, 3 – опыты с BAPTA-AM.

А – частота МТКП при действии гиперкалиевого раствора (K-40 мМ), внесклеточное отведение, Б – картины флуоресценции и В – средняя интенсивность свечения терминалей после 5-мин экспозиции гиперкалиевого раствора в присутствии FM-1-43 и последующей 30-мин отмывки, Г – кумулятивные кривые количества освобожденных квантов медиатора при высокочастотном раздражении. Пунктирная линия проведена через значение 180000 квантов. Д – картины флуоресценции и Е – средняя интенсивность свечения терминалей после высокочастотного раздражения в присутствии FM-1-43 и последующей 30-мин отмывки. Продолжительность раздражения подобран по линии, проведенной на рис. 2Г.

около 180000 квантов в контроле и при использовании EGTA-AM освобождается примерно за одну минуту, а при использовании BAPTA-AM – за 3.5 мин стимуляции (рис. 2Г).

Высокочастотное раздражение продолжительностью 1 мин в стандартном растворе в присутствии FM 1-43 приводило к появлению флуоресцирующих пятен (Рис. 2 Д-Е). При использовании внутриклеточных Са-хелаторов флуоресцирующие пятна появлялись в случае применения EGTA-AM (раздражение 1 мин), однако отсутствовали при использовании BAPTA-AM (раздражение 3.5 мин) (Рис. 2 Д-Е).

Как стимуляция спонтанной (гиперкалиевый раствор), так и вызванной (ритмическое раздражение) предварительно окрашенных терминалей приводила к выгрузке красителя, что свидетельствует о сохранности процессов экзоцитоза СВ. Влияние различных Са-буферов на секрецию медиатора и процессы экзо- и эндоцитоза позволяет сделать целый ряд заключений об аффинности и расположении Са-сенсоров, отвечающих за слияние и повторное образование СВ. Известно, что скорость связывания ионов Са у ВАРТА примерно в 150 раз выше, чем у EGTA, поэтому ВАРТА, как более быстрый буфер, сильнее ограничивает размеры «облака» ионов Са в области устья открытого Са-канала, чем EGTA [E. Neher, 1998; E. Neher and T. Sakaba, 2008]. В результате, применение ВАРТА-АМ должно приводить к более выраженному эффекту на интенсивность процессов, запускаемых увеличением внутриклеточной концентрации Са около одиночного Са-канала, т.е. Са-микродоменом. Электрофизиологические данные демонстрируют, что запуск вызванной секреции осуществляется в области Са-микродомена, а спонтанной в гиперкалиевых растворах - определяется Са-макродоменом. Что касается эндоцитоза везикул, то тут ситуация иная. Оказалось, что, в случае стимуляции как спонтанной, так и вызванной секреции процесс эндоцитоза СВ определяется Са-микродоменом в районе одиночного Са-канала и, скорее всего, протекает в областях с низкой плотностью Са-каналов, т.е. вне активных зон. Отсюда можно считать, что эндоцитоз запускается высокопороговым Са-сенсором, для активации которого необходимы достаточно большие концентрации ионов Са.

Оценка чувствительности внутриклеточных кальций-связывающих сайтов экзоцитоза и эндоцитоза синаптических везикул к катионам Са, Sr, Ba и Mg.

В Са-, Sr-, Ba- или Mg- растворах при внеклеточном отведении частота МТКП составляла $0,24 \pm 0,06$ ($n=21$), $0,28 \pm 0,1$ ($n=15$), $1,4 \pm 0,5$ ($n=15$), и $0,2 \pm 0,05$ с^{-1} ($n=17$), соответственно (рис. 3А). Для исследования способности различных двухвалентных катионов поддерживать спонтанную секрецию медиатора был использован гиперкалиевый раствор (К-40 мМ). Оказалось, что при наличии в перфузируемом растворе любого исследуемого катиона аппликация гиперкалиевого раствора приводила к резкому и примерно одинаковому увеличению частоты МТКП. Через 5 мин гиперкалиевой деполяризации в растворах с ионами Са, Sr, Ba, Mg частота МТКП возрастала до $7,25 \pm 0,9$ ($n=23$), $8,1 \pm 0,8$ ($n=20$), $9,0 \pm 1,0$ ($n=21$) и $9,5 \pm 1,2$ с^{-1} ($n=17$), соответственно. Резкое увеличение частоты МТКП при гиперкалиевой деполяризации свидетельствует о том, что все исследованные катионы могут поступать в НО через Са каналы, а сайт спонтанного экзоцитоза способен примерно одинаково активироваться катионами щелочноземельных металлов. Примерно одинаковая частота МТКП

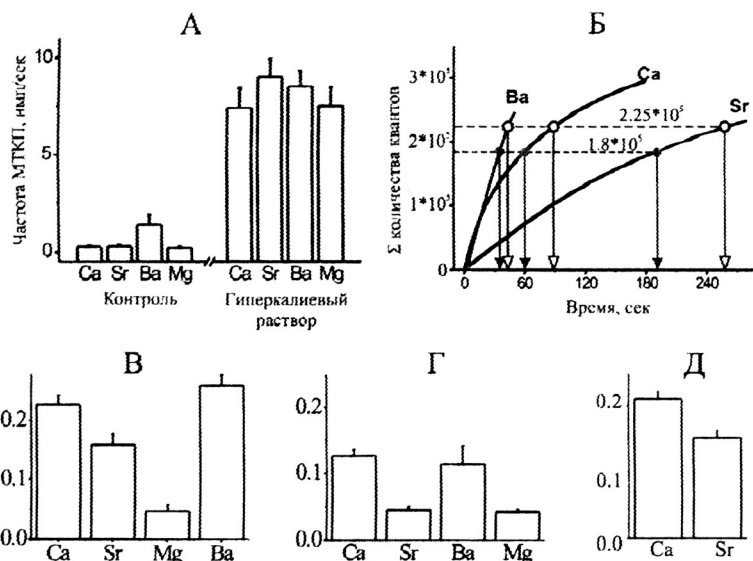


Рис. 3. Экзоцитоз и эндоцитоз синаптических везикул при использовании катионов различных щелочноземельных металлов.

А – частота МТКП в контроле (К-2.5 мМ) и в гиперкалиевом растворе (К-40 мМ) при использовании Ca, Sr, Ba и Mg. Б – кумулятивные кривые количества освобожденных квантов медиатора при высокочастотном раздражении в растворах с ионами Ca, Sr и Ba. Пунктирные линии проведены через значения 180000 квантов (черные кружки), и 225000 квантов (белые кружки). Стрелками указаны временные интервалы раздражения, при которых освобождается одинаковое количество квантов медиатора в Ca-, Sr- и Ba- растворах. В - столбиковая диаграмма средней интенсивности свечения нервных терминалей, в отн.ед. в гиперкалиевом растворе (1 мин), содержащем ионы Ca, Sr, Ba или Mg. Г - столбиковая диаграмма средней интенсивности свечения нервных терминалей, в отн.ед. при раздражении с частотой 20 имп/с в растворах, содержащих ионы Ca, Sr, Ba или Mg. Продолжительность раздражения подобрана по линиям, проведенным через значение 180000 квантов на рис. 3Б. Г - столбиковая диаграмма средней интенсивности свечения нервных терминалей, в отн.ед., при продолжительном ритмическом раздражении в растворах, содержащих ионы Ca и Sr. Продолжительность раздражения подобрана по линиям, проведенным через значение 225000 квантов на рис. 2Д.

в Са-, Sr-, Ва- и Mg- растворах ($p > 0.05$) свидетельствует, что в единицу времени одинаковое количество везикул сливаются с пресинаптической мембраной (рис 3А).

Экспозиция этих растворов в присутствии FM 1-43 продемонстрировала различия в загрузке красителя. В Са- и Ва- растворах 1-мин экспозиция гиперкалиевого раствора с красителем приводила к появлению в НО ярко светящихся пятен, Sr- растворах интенсивность свечения была несколько ниже ($p < 0.05$), а в Mg- растворах - пятна не появлялись (рис. 3 В). При внутриклеточном отведении раздражение двигательного нерва в Са- и Sr- растворах вызывало появление многоквантовых ПКП (синхронная секреция медиатора). В Sr- растворах квантовый состав ПКП был значительно ниже, чем в Са-растворах, и составлял $41,4 \pm 10$ квантов ($n = 6$). В процессе высокочастотного раздражения наблюдалось первоначальное примерно двукратное увеличение квантового состава ПКП, а затем его медленное снижение. К 3 мин раздражения квантовый состав ПКП составлял $98,4 \pm 0,2 \%$ ($n = 6$) от исходного уровня. Сравнение кумулятивных кривых количества освобожденных квантов медиатора при ритмическом раздражении двигательного нерва показало, что за одну мин в Са- растворах освобождается около 180000 квантов, в то время как в Sr- растворах это количество квантов освобождается примерно за 3 мин. За 1,5 мин в Са- растворах освобождалось около 225000 квантов, а в Sr- растворах такое количество квантов освобождается примерно за 4 мин (Рис. 3Б). В Mg- растворах в ответ на раздражение нерва синхронная секреция отсутствовала (ПКП не наблюдались).

В Ва- растворах раздражение двигательного нерва не вызывало синхронной секреции медиатора (многоквантовые ПКП отсутствовали). Длительное высокочастотное раздражение приводило к появлению огромного количества асинхронно возникающих одноквантовых сигналов (резкому увеличению частоты МПКП), которые, суммируясь друг с другом, вызывали деполяризацию мышечных волокон. Определить частоту МПКП и, соответственно, количество освобожденных квантов медиатора при внутриклеточном отведении было невозможно. Поэтому для приблизительной оценки секреции медиатора при высокочастотном раздражении в Ва- растворах было применено 2 метода. Первый использованный метод основан на определении частоты асинхронно возникающих одноквантовых сигналов по значению производимой ими деполяризации постсинаптической мембраны с использованием формулы

$$n = V(1 - V/(\varepsilon - E))^{-1} (\alpha * \tau)^{-1} \quad [\text{Е.М. Silinsky, 1978}]$$

Где n – частота спонтанной секреции медиатора, с^{-1} ; α – средняя амплитуда МПКП; τ – временная постоянная МПКП, мсек, V – деполяризация цитоплазматической мембраны, мВ; E – мембранный потенциал покоя, мВ; ε – равновесный потенциал ацетилхолина, ≈ -15 мВ [Е.М. Silinsky, 1978].

После начала стимуляции быстро, в течение нескольких секунд, развивалась деполаризация мембраны с $-45 \pm 2.6 \text{ мВ}$ ($n=9$) до $-37 \pm 2.8 \text{ мВ}$ ($n=9$) сохранявшаяся все время 40-сек раздражения. Используемая формула позволяет считать, что данная деполаризация может наблюдаться при возникновении МТКП с частотой $6200 \text{ имп/сек} \pm 450 \text{ с}^{-1}$ ($n=9$).

Второй использованный метод - внеклеточное отведение, при котором регистрируются сигналы от небольшого участка НО. В этом случае через 10 с высокочастотного раздражения частота МТКП составила $145,3 \pm 10 \text{ с}^{-1}$ ($n=8$), которое сохранялось в течение всего раздражения. Опираясь на наши и литературные [Р.А. Rawson et al., 1998] данные, о том, что средняя протяженность двигательного НО кожно-грудинной мышцы лягушки (суммарная длина всех терминалей) составляет около 300 мкм, а внеклеточный электрод регистрирует постсинаптические сигналы от участка синапса длиной около 8 мкм [А.Л. Зефилов и др., 1990], производился расчет частоты МТКП во всем синапсе, умножая внеклеточно регистрируемую частоту МТКП на 37,5. Расчеты показали, что частота МТКП в синапсе в Ва-растворах составляет $5450 \pm 380 \text{ с}^{-1}$ ($n=8$). Таким образом, определяемая частота МТКП при высокочастотном раздражении в Ва-растворах при использовании обоих методов подсчета не отличалась ($p > 0.05$). При сравнении кумулятивных кривых освобожденных квантов медиатора видно, что одинаковое количество квантов (около 184000) освобождается из НО в Са-растворах в течение 1 мин, а в Ва-растворах – примерно за 30 сек (Рис. 3Б).

Для изучения процессов эндоцитоза использовались параметры стимуляции, при которых наблюдалось одинаковое количество освобожденных квантов. Так, светящиеся пятна наблюдались только в Са- (1мин) и Ва- (30 сек) растворах (Рис. 3 Г). Отсутствие загрузки в Sr- растворах могло быть связано с полным отсутствием способности данных ионов поддерживать эндоцитоз. Поэтому была проведена дополнительная серия экспериментов с увеличенным временем раздражения, 1,5 мин в Са- растворах и 4 мин – в Sr- растворах, при которых количество освобожденных квантов было снова одинаково (около 225000). При этом светящиеся пятна появлялись и в Sr- растворах, но яркость свечения НО была значительно меньше, чем в Са- растворах ($p < 0.05$) (Рис. 4Д).

При воздействии гиперкалиевого раствора с ионами Са, Sr, Ва или Mg, а также при ритмическом раздражении в растворах с ионами Са, Sr, Ва через 15 мин наблюдается полная выгрузка FM 1-43 из предварительно окрашенных препаратов, что свидетельствует о сохранности процессов полного экзоцитоза СВ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование продемонстрировало, что в двигательном нервном окончании лягушки существуют отдельные Са-связывающие сайты для экзоцитоза и эндоцитоза СВ.

В механизмах спонтанного экзоцитоза принимает участие Са-связывающий сайт, активирующийся в области Са-макродомена, обнаруживающий сходную чувствительность к ионам Са, Sr, Ba, Mg и запускающий полный экзоцитоз СВ. Учитывая его работу при сравнительно низкой концентрации ионов Са (<10 мкМ) [E. Neher, 1998], сенсор должен быть низкопороговым. Полученные данные свидетельствуют о том, что этот сайт не обладает селективностью и способен активироваться практически всеми катионами щелочноземельных металлов (Са, Sr, Ba и Mg). Наиболее вероятным молекулярным кандидатом сайта служит белок мембраны СВ - синаптотагмин [E.R. Chapman, 2008, T.C. Sudhof, 2008]. Несмотря на обнаруженную различную аффинность Са-связывающего домена синаптотагмина к различным двухвалентным катионам [M. Fukuda, 1997], одинаковая частота МТКП в Са-, Sr-, Ba- и Mg- растворах при гиперкалиевой деполяризации может быть объяснена достижением достаточной для активации сайта спонтанного экзоцитоза концентрации этих катионов в макродомене. Наиболее вероятным кандидатом служит синаптотагмин III - высокоаффинная изоформа, для которой обнаружена способность связывать катионы Са, Sr, Ba и Mg [M. Fukuda, 1997, T.C. Sudhof, 2004].

В механизмах вызванного, синхронного экзоцитоза, по всей видимости, происходит активация высокопорогового сайта, которая осуществляется кальциевым микродоменом в области открытого Са- канала, на что указывают данные о различном влиянии быстрого и медленного кальциевого хелатора. Сайт фазного экзоцитоза оказался чувствителен только к ионам Са и Sr, с меньшей аффинностью к катионам Sr, и не чувствителен к ионам Ba и Mg. Вероятно, данный сайт представлен низкоаффинной изоформой, синаптотагмином I, который обладает такими свойствами [T.C. Sudhof, 2004].

Механизмы увеличения асинхронного экзоцитоза и спонтанной секреции медиатора при ритмическом раздражении в растворах с ионами Ba остаются неизвестными и требуют дальнейшего изучения. Можно высказать несколько предположений на этот счет. Возможно, существует отдельный сайт асинхронного освобождения медиатора, активируемый только ионами Ba. Не исключено, что вследствие резко замедленной способности нервной клетки выводить и утилизировать ионы Ba по сравнению с ионами Са и Sr [E. Neves et al., 2001], внутриклеточная концентрация Ba при высокочастотной активности резко увеличивается, что может приводить к формированию Ba- макродомена и активации низкопорогового сайта асинхронного освобождения, либо «ломке» обычных механизмов экзоцитоза СВ с переводом сайта синхронного освобождения в асинхронный.

Оказалось, что независимо от способа экзоцитоза (спонтанного или вызванного) процесс эндоцитоза СВ запускается универсальным Са-зависимым механизмом, который активируется в области Са-микродомена и характеризуется чувствительностью к ионам Са, Sr и Ba, с наименьшей аффинностью к ионам Sg и не обладает чувствительностью к ионам Mg. Это отличает эндоцитоз от экзоцитоза, в осуществлении которого принимают участие несколько различных по своим свойствам Са- сенсоров. Са-зависимый сайт эндоцитоза, может быть представлен целой группой белков, участвующих в клатриновом эндоцитозе. Не исключено, что внутриклеточный кальций запускает процессы дефосфорилирования/фосфорилирования амфилизина, AP180, динамина, Eps15, эпсина, PIP5K, синаптоянина и др., которые осуществляются с участием Са-связывающих белков кальмодулина и кальциневрина [O. Shupliakov, 2008; M.A. Cousin and P.J. Robinson, 2001; P. De Camilli, 2001].

Можно считать, что вход внеклеточных ионов Са с одной стороны, обеспечивает запуск спонтанного или вызванного экзоцитоза, а с другой – эндоцитоза СВ. Ионы Са могут служить необходимым фактором, поддерживающим сохранение соотношения процессов экзо- и эндоцитоза СВ.

ВЫВОДЫ:

- 1.) Гиперкалиевые растворы (0.25-40 мМ), кофеин (1-6 мМ), сахароза (30-100 мМ) вызывают дозозависимое увеличение частоты МТКП. Деполаризация мембраны постоянным током вызывает увеличение частоты МТКП, определяемой значением силы тока. Частота МТКП примерно одинакова при действии ионов калия в концентрации 40 мМ или постоянного тока силой 4мА, а также при добавлении кофеина (5 мМ) или сахарозы (30мМ).
- 2.) Выдерживание препарата в гиперкалиевом растворе (40 мМ), также как и в растворе с кофеином (5 мМ) или воздействие постоянного деполаризующего тока силой 4 мА в течение 5 мин в присутствии FM1-43 приводят к загрузке эндоцитозного красителя FM 1-43 в НО (появляются светящиеся пятна). Выдерживание предварительно окрашенного препарата в гиперкалиевом растворе (40 мМ), растворе с кофеином (5 мМ) или воздействие постоянного деполаризующего тока силой 4 мА в течение 15 мин приводят к выгрузке эндоцитозного красителя из НО (светящиеся пятна исчезают, интенсивность свечения падает).
- 3.) При использовании гипертонического раствора сахарозы (30 мМ) наблюдается отсутствие как загрузки, так и выгрузки FM 1-43.

- 4.) В гиперкалиевом растворе (40 мМ) как быстрый (BAPTA-AM), так и медленный (EGTA-AM) внутриклеточные Са-буферы приводят к одинаковому снижению частоты МТКП. Снижение квантового состава ПКП при высокочастотном раздражении отмечается при использовании обоих буферов, но эффект быстрого буфера более выражен.
- 5.) В гиперкалиевом растворе или при ритмическом раздражении загрузка FM 1-43 при использовании BAPTA-AM не происходила, но имела место в случае EGTA-AM. Выгрузка наблюдалась в опытах как с BAPTA-AM, так и с EGTA-AM.
- 6.) Аппликация гиперкалиевого раствора, содержащего ионы Са, Sr, Ba или Mg приводила к примерно одинаковому увеличению спонтанной секреции (частоты МТКП). При высокочастотном раздражении примерно одинаковое количество квантов (180000) освобождалось за одну мин в Са- растворах, за 3 мин Sr- растворах и за 30 сек в Ba- растворах. Примерно 225000 квантов освобождалось за 1,5 мин в Са- растворах и 4 мин в Sr- растворах.
- 7.) Гиперкалиевый раствор (40 мМ), содержащий ионы Са, Sr, Ba или Mg, приводил к загрузке красителя только при использовании ионов Са, Sr или Ba. Выгрузка FM 1-43 наблюдалась при использовании ионов Са, Sr, Ba или Mg.
- 8.) Высокочастотное раздражение в условиях одинакового экзоцитоза (около 180000 квантов) приводит к захвату красителя при использовании ионов Са или Ba. Загрузка в Sr-растворах возможна при увеличенном времени раздражения, но при этом остается более слабой, чем при использовании Са-растворов. Выгрузка красителя наблюдается при использовании как ионов Са, так и Sr или Ba.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Секретия медиатора в нервно-мышечном синапсе после длительного воздействия бескальциевых растворов / А.Л. Зефирова, Р.Д. Мухамедзянов, М.Г. Минлебаев и др. // Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. – 2002. - Т. 88, №2. - С. 191-204.
2. Differences of spontaneous and evoked monoquantal signals in the frog neuromuscular junction / L. Zefirov, A.I. Skorinkin, K.F.Hafizov, P.N. Grigoryev et al. // Neurophysiology. – 2002. - V.34, №2/3. - P. 181-184.
3. Прижизненное флуоресцентное исследование двигательного нервного окончания лягушки с использованием эндоцитозного маркера FM 1-43 / А.Л. Зефирова, П.Н. Григорьев, А.М. Петров и др. // Цитология. – 2003. - Т.45, №12. - С. 34-40.
4. Григорьев П.Н. Неоднородность экзо-эндоцитозного цикла в нервно-мышечном синапсе лягушки / П.Н. Григорьев, М.М. Абдрахманов, М.А. Мухамедьяров // Материалы III конф. молодых ученых России с международным участием «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины». - Москва, 2004. - С. 384.
5. Зефирова, А.Л. «Kiss-and-run» механизм квантовой секреции медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки / А. Л. Зефирова, М. М. Абдрахманов, П. Н. Григорьев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2004. - Т.137, N2. - С.124-128.

6. Григорьев П.Н. Топография мест эндоцитоза синаптических везикул / П.Н. Григорьев, А.М. Петров, М.М. Абдрахманов // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2004. – Т.29, №34. – С. 177-178.
7. Grigoryev, P. N. The calcium entry initiate the endocytosis processes at the frog neuromuscular junction / P. N. Grigoryev, M. M. Abdrakhmanov // International workshop in cell physiology IBRO "Transport mechanisms across cell membranes: channel and pumps". - St.Petersburg, Russia, 2004. - P. 35.
8. Григорьев П.Н. Блок входа внеклеточного кальция прекращает эндоцитоз в нервно-мышечном синапсе лягушки. / П.Н. Григорьев, М.М. Абдрахманов / Материалы всероссийской конференции молодых исследователей «Физиология и медицина». Вестник молодых ученых, приложение к серии «Науки о жизни», Санкт-Петербург, 2005. - С. 29.
9. Григорьев П.Н. Роль внеклеточного кальция в процессах эндоцитоза. / П.Н. Григорьев, М.М. Абдрахманов, А.Л. Зефилов / Тезисы докладов 9-й международной Пушкинской школы-конференции молодых ученых – Пушкино, 2005. - С. 111.
10. Grigoryev P. N. The endocytosis processes at the frog neuromuscular junction are initiated by calcium ions / P. N. Grigoryev, M. M. Abdrakhmanov // The FEBS journal. –2005. –V. 272, Supplement 1. - P. 236.
11. Зефилов, А. Л. Эффекты гиперкалиевых растворов и кофеина на процессы экзо-эндоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании лягушки. / А. Л. Зефилов, М. М. Абдрахманов, П. Н. Григорьев // Рос. Физиол. Журнал им. И.М. Сеченова. – 2005 - Т. 91, № 7 - С. 821-831.
12. Внутриклеточный кальций и механизмы эндоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании лягушки. / А. Л. Зефилов, М. М. Абдрахманов, П. Н. Григорьев, А. М. Петров // Цитология. – 2006. - Т.48, №1 - С. 34-41.
13. P.N. Grigoryev Calcium influx is necessary for retrieval of synaptic vesicles at neuromuscular junction of the frog. / P.N. Grigoryev, M.M. Abdrakhmanov // Abstract book of 5th Forum of European Neuroscience. Vienna, Austria, 2006. – P. 468.
14. The role of extracellular calcium in exo- and endocytosis of synaptic vesicles at the frog motor nerve terminal / Zefirov AL, Abdrakhmanov MM, Mukhamedyarov MA, Grigoryev P.N. // Neuroscience. - 2006. - V. 143, №4. – P. 905-910.
15. Григорьев П.Н. Внутриклеточный кальций-связывающий сайт эндоцитоза / П.Н. Григорьев, А.Л. Зефилов // Сборник тезисов XX Съезда Физиологического общества им. И.П.Павлова, Москва, 2007. – С. 202.
16. Григорьев П.Н. Высокоаффинный кальций-чувствительный сайт эндоцитоза. / П.Н. Григорьев, А.Л. Зефилов // Сборник тезисов международной конференции "Рецепция и внутриклеточная сигнализация". Пушкино, 2007. – С. 119-121.
17. Григорьев П.Н. Нарушение соотношения процессов экзоцитоза и эндоцитоза при блокаде входа внеклеточных ионов кальция в двигательном нервном окончании лягушки // Неврологический вестник. – 2007. – Т. 39, №1. - С. 96.
18. Grigoryev P.N. The role of calcium influx in retrieval of synaptic vesicles at the neuromuscular junction of the frog / P.N. Grigoryev, A.L. Zefirov // Abstract book of PENS-Blackwell Summer School 2007 "Advanced Course in Neuroplasticity". Rome, Italy. 2007. – P. 38.
19. Григорьев П.Н. Аффинность внутриклеточного сайта эндоцитоза к двухвалентным катионам / Григорьев П.Н., Зефилов А.Л. // Сборник тезисов докладов VI Сибирского физиологического съезда. Барнаул, 2008. - Т.2. - С. 19-20.

Отпечатано в типографии "Первый печатный двор"
Г. Казань, ул. Университетская 11, оф. 2
Подписано в печать 01.11.2008 г. Заказ №0026.
Тираж 100 экз. Форм. Бум. 60х80. 1/8. Усл. п.л. 1,0.
Бумага офсетная. Печать – ризография.

